

### Список литературы

1. Шнейдер Е. Ю., Каримова Е. В. АФР возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Shaad et al.) для территории РФ. 2013.
2. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* / O. Bahar, M. Efrat, E. Hadar, B. Dutta, R. R. Walcott, S. Burdman // Plant Pathology. 2008. Vol. 57. P. 754–763.
3. PM7/127(1) *Acidovorax citrulli* // EPPO. 2016.
4. Grubben G. J. H., Denton O. A. Plant resources for tropical Africa 2. Vegetables. PROTA Foundation, Wageningen, NL, Backhuys Publishers, Leiden NL // СТА Wageningen. 2004. 668 p.
5. Woudt B., Koenraadt H. M. S., Oosterhof J., van Betteray B. Development of specific primers for the molecular detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Proceedings of the EPPO Conference on diagnostics. 2009. URL: [http://archives.eppo.int/MEETINGS/2009\\_conferences/diagnostic/Diag\\_York2009\\_brochure.pdf](http://archives.eppo.int/MEETINGS/2009_conferences/diagnostic/Diag_York2009_brochure.pdf).
6. Shaad N. W., Song W. Y., Hatziloukas E. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. 2000. US Patent 6, 146, 834.

УДК 632.4:635.2:635.21

К. О. Дейч<sup>1</sup>, М. М. Никитин<sup>1</sup>,  
Н. В. Стацюк<sup>2</sup>, В. Г. Джавахия<sup>2</sup>,  
А. Г. Голиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «ГенБит»,  
117246, Россия, Москва, пр. Научный, 20 стр. 2,  
[golikov@genbitgroup.com](mailto:golikov@genbitgroup.com);

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский  
институт фитопатологии,  
143050, Россия, Московская обл., р.п. Большие Вяземы,  
ул. Институт, вл. 5,  
[nataafg@gmail.com](mailto:nataafg@gmail.com)

### РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ РАКА КАРТОФЕЛЯ (*SYNCHYTRIUM ENDOBIOITICUM*) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ\*

**Ключевые слова:** *Synchytrium endobioticum*, картофель, ПЦР в реальном времени, экспресс-диагностика.

\*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16–16–04109).

© Дейч К. О., Никитин М. М., Стацюк Н. В., Джавахия В. Г., Голиков А. Г., 2018

Рак картофеля, вызываемый внутриклеточным облигатным грибом *Synchytrium endobioticum*, относится к наиболее опасным и экономически значимым болезням картофеля. Потери урожая, связанные с этим патогеном, могут превышать 60% [1]. Зооспорангии *S. endobioticum* способны сохраняться в почве зараженных полей до 30 лет без потери жизнеспособности, что, наряду с высокой пластичностью патогена и трудностью его искоренения, привело к тому, что во многих странах этот гриб был включен в список карантинных объектов. Помимо проверок импортируемых и экспортируемых партий картофеля, диагностика, направленная на обнаружение данного патогена, важна также для обследований посадок картофеля и их фитосанитарного мониторинга.

Целью настоящего исследования была разработка высокочувствительной тест-системы для детекции и идентификации *S. endobioticum*, пригодной для использования в составе диагностических qPCR-микроматриц для одновременной детекции широкого спектра болезней картофеля [2]. Подбор праймеров и зонда осуществляли на базе анализа ITS1–5.8S–ITS2–28S регионов ДНК *S. endobioticum*, включенных в базу данных NCBI. Выравнивание последовательностей осуществляли при помощи алгоритма ClustalW. Дизайн праймеров и зонда выполняли в программе Oligo 6.0 с учетом стандартных условий амплификации, используемых в микрочиповом амплификаторе AriaDNA для работы с микроматрицами. Предварительную проверку специфичности подобранных праймеров проводили с использованием алгоритма Blast. Ввиду существующих ограничений на оборот карантинных объектов, оценку эффективности, чувствительности и воспроизводимости разработанной тест-системы проводили с использованием шести образцов ДНК *S. endobioticum*, выделенных из образцов, собранных в Московской, Тамбовской и Пермской областях и предоставленных Всероссийским центром карантина растений. Условия амплификации включали денатурацию (94 °С, 120 мин) и 45 циклов: 94 °С (5 с) и 60 °С (30 с). Оценка специфичности праймеров проводили с использованием культур других грибных и оомицетных патогенов картофеля, включая *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, а также ДНК *Spongospora subterranea*.

В результате выполненной работы были подобраны следующие видоспецифичные праймеры: AACACCATGTGAACTGTTTGA (F) и CACAGAGCTTGGATATGAAAA (R), а также зонд: TTCTTGGGCAAGTGGATGTGG. Чувствительность тест-системы составила ~0,1 нг/мл, что, с учетом реакционного объема (1 мкл) соответствует 0,1 пг ДНК (рис. 1). Проверка на воспроизводимость (пятикратная повторность) показала, что отклонение значения *Ct* не превышает 1–4%. Проверка на специфичность показала, что тест-система способна обнаруживать все шесть использованных в исследовании образцов ДНК *S. endobioticum* и не дает перекрестной реакции на другие грибные патогены картофеля.

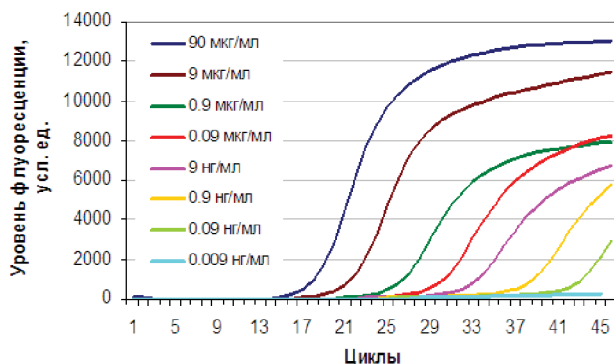


Рис. 1. Чувствительность тест-системы для детекции *Synchytrium endobioticum*

Таким образом, разработанная тест-система обеспечивает высокую чувствительность детекции (0,1 пг ДНК), а также хорошую воспроизводимость и видоспецифичность. На следующих этапах исследования необходимо проведение ее валидации на инфицированных образцах почвы и растительных тканей.

#### Список литературы

1. Хютти А. В., Коваленко Н. М. Рак картофеля снова требует внимания // Защита и карантин растений. 2008. № 5. С. 43.
2. Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR / М. М. Nikitin, N. V. Statsyuk, P. A. Frantsuzov, V. G. Dzhavakhiya, A. G. Golikov // J. of Applied Microbiology. 2018. Vol. 124 (3). P. 797–809.

УДК 632.3.01

А. Б. Яремко, К. П. Корнев

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»,  
140150, Россия, Москва, р-н Быково, ул. Пограничная, 32,  
an\_ya94@mail.ru

#### РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО УВЯДАНИЯ (ВИЛТА) КУКУРУЗЫ *PANTOEAE STEWARTII* SUBSP. *STEWARTII*

**Ключевые слова:** бактериальное увядание, вилт, кукуруза, диагностика.

Бактериальное увядание (вилт) кукурузы широко распространено на территории стран американского континента, где наносит значительный ущерб. В связи с внедрением сельскохозяйственных культур в новые регионы, расши-